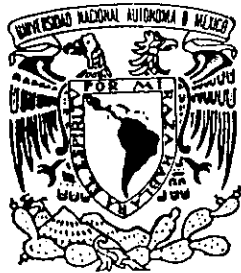


82  
2eq.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**EFFECTOS DE LA SUPLEMENTACION CON ZINC  
SOBRE LA RESPUESTA FAGOCITICA DE RATONES  
EN ETAPAS PERINATALES.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

**P R E S E N T A :**

**BIBIANA MONROY DOMINGUEZ**



MEXICO, D. F.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



266323

**EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA**

1998.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Jurado asignado según el tema:**

**Presidente:** Prof. Meza Ruiz Graciela

**Vocal:** Prof. Lastra Azpilicueta María Dolores

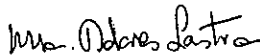
**Secretario:** Prof. Hernández Montes Homero

**1er. suplente:** Prof. López González José Sullivan


**2o. suplente:** Prof. Giral Barnés Carmen

Sitio donde se desarrolló el tema:  
Laboratorio de Investigación en Inmunología,  
del Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM.


Asesor del tema:  
M en C. Ma. Dolores Lastra Azpilicueta

  
\_\_\_\_\_

Supervisor Técnico:  
M en C Ana Esther Aguilar Cárdenas

  
\_\_\_\_\_

Sustentante:  
Bibiana Monroy Domínguez

  
\_\_\_\_\_

## AGRADECIMIENTOS

GRACIAS a Dios por todas las cosas maravillosas que me ha dado, por poner en mi camino a tanta gente extraordinaria que me ha ayudado, y por la luz que me dio para terminar esta bella etapa de mi vida.

GRACIAS a mi papá por su amor, su confianza y su apoyo, siempre te amaré y espero que siempre seas tan feliz como lo soy yo por tenerte como padre, gracias por darme todo de ti.

GRACIAS a mi mamá por ser mi guía, mi amiga, mi confidente y mi más grande instructora, tendría muchos motivos para decirte gracias pero quiero que sepas que siempre he deseado ser como tu, te admiro mucho, que bueno que eres mi madre.

GRACIAS a mis hermanos Fernando, Alberto, Adrián y Mónica por ser mi inspiración, mi apoyo y hasta mi mayor y mi más grande motivo para llegar hasta donde hoy estoy.

GRACIAS a Rogelio por ser el hombre más tierno, dulce y paciente, por ese amor que me has brindado y por el apoyo incondicional que me has dado. Te admiro por tu entusiasmo para realizar las cosas y por el empeño con el que realizas todas tus actividades, gracias mi amor.

GRACIAS a mi cuñada Carolina por el apoyo moral que me ha brindado y por mis dos sobrinas.

GRACIAS a todos mis profesores del jardín de niños, primaria, secundaria, CCH y Facultad de Química, mencionar alguno sería difícil por que todos y cada uno de ellos me dio lo mejor de sí, me enseñaron todo lo que podían y me ayudaron siempre.

GRACIAS a mis profesores Patricia, Gerardo y Luis que además de transmitirme sus conocimientos se convirtieron en un apoyo económico, moral y hasta social para mí.

GRACIAS a mis amigos que en su momento compartieron todos los momentos buenos y malos, tengan la seguridad que nunca los olvidare por que aunque estén lejos o se hayan ido, siempre vivirán en mí.

GRACIAS a la M en C Ma. Dolores Lastra, M en C Ana Esther Aguilar y M en C Rodolfo Pastelin, por su ayuda y asesoramiento para la elaboración de este trabajo.

GRACIAS a todas aquellas personas del bioterio y del laboratorio que de alguna forma colaboraron en la realización este trabajo.

***Cuando pienses, vivirás  
Piensa lo bueno y se te dará.***

# INDICE

	Pag.
ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
INTRODUCCION	10
ANTECEDENTES	12
1.- GENERALIDADES	12
2.- PROCESOS METABÓLICOS EN LOS QUE INTERVIENE.	13
3.- IMPORTANCIA EN EL DESARROLLO Y LA RELACIÓN CON LA DESNUTRICION	13
4.-EFECTO DEL ZINC EN LA ETAPA PERINATAL	15
5.-EL ZINC Y EL SISTEMA INMUNE	16
6.- CELULAS FAGOCITICAS	17
6.1.-POLIMORFONUCLEARES (PMN)	18
6.2.-MONONUCLEARES (MN)	18
6.3.-MARCADORES Y CITOCINAS EN MACROFAGOS	19
7. PARTICIPACION DEL ZINC EN ESTOS PROCESOS	22
8.-FAGOCITOSIS	23
9.-TOXICIDAD DEL ZINC	24
ANTECEDENTES DEL PROYECTO	26
OBJETIVOS	28
HIPOTESIS	28
MATERIALES Y METODOS	29
DISEÑO EXPERIMENTAL	29

## INDICE

1.- OBTENCION DE MACROFAGOS	30
2.- ADHESIÓN DE MACROFAGOS	30
3.- FAGOCITOSIS DE ERITROCITOS DE CARNERO	31
RESULTADOS Y DISCUSION	33
1.- ESTANDARIZACION	33
2.- MODELO BIOLOGICO	37
ANALISIS ESTADISTICO	42
CONCLUSIONES	44
ANEXO I: TECNICAS PARA EVALUAR FUNCIONALIDAD	45
BIBLIOGRAFIA	48

## ABREVIATURAS

CSF	Factor estimulante de colonias
DAB	3, 3'- Diaminobencidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EP	Pirogeno endogeno
Fc	Fracción cristalina
GH	Hormona de crecimiento
IF	Indice fagocitico
IFN $\alpha$	Interferon alfa
IFN $\beta$	Interferon beta
IFN $\gamma$	Interferon gama
GR	Glóbulos rojos
GRS	Glóbulos rojos opsonizados
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
ml	mililitros
MN	Células mononucleares
nm	nanometros
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PMN	Polimorfonucleares
ppm	partes por millón
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Duodesil sulfato de sodio



## RESUMEN

En la última década el estudio de los elementos traza ha cobrado gran importancia, debido a que son esenciales tanto para el desarrollo y mantenimiento del organismo, como para una nutrición adecuada. Se ha reconocido la influencia de factores nutricionales sobre la función del sistema inmunitario por la demostración de la incidencia de varias enfermedades infecciosas y la existencia de atrofia de órganos linfoides en niños con desnutrición atribuible a una deficiencia de zinc.

El zinc es un bioelemento cuyas características químicas lo hacen sumamente versátil para ser empleado en múltiples procesos bioquímicos, por una gran cantidad de sistemas biológicos.

El zinc juega un papel primordial en una gran variedad de sistemas metabólicos. Es cofactor esencial de enzimas relacionadas con la proliferación celular como en DNA y RNA polimerasas, así como las que intervienen en la síntesis y degradación de metabolitos como la deshidrogenasa alcohólica, etc.

Es importante mencionar que durante las etapas de la gestación, la lactancia y la postlactancia, se presentan inmunodeficiencias fisiológicas transitorias, en donde se han observado niveles bajos de zinc, por lo cual este elemento podría funcionar como inmunomodulador del sistema inmunológico en esos periodos.

La falta de zinc ocasiona alteraciones en la quimiotaxis tanto en leucocitos neutrófilos como en monocitos. La importancia del zinc sobre la permeabilidad de la membrana y la actividad fagocítica se ha podido ver en diversos estudios, en donde se ha encontrado que cantidades elevadas de zinc inhiben el flujo a través de la membrana de macrófagos, neutrófilos, células mastoides y plaquetas.

La suplementación de zinc y otros micronutrientes, a una población aparentemente sana de individuos seniles, mejora su inmunidad y disminuye el riesgo de infecciones en esta etapa. (12)

Este trabajo está dirigido principalmente a evaluar el efecto de la suplementación de zinc en la respuesta fagocítica de macrófagos peritoneales de ratones BALB/c, a distintas etapas perinatales.

La deficiencia de zinc es importante en ciertos estados de la ontogenia; por tal motivo se decidió investigar el efecto de la suplementación de zinc durante los períodos de gestación, lactancia y postlactancia. Se implementa una nueva metodología espectrofotométrica para seguir la respuesta eritrofagocítica de fagocitos peritoneales. (27)

Con este objetivo, se implantó y estandarizó la metodología que nos permitió medir la funcionalidad de los macrófagos, los cuales son extraídos del peritoneo de los ratones, y se colocaron para su adherencia en una placa, la que se incubó, para posteriormente agregarle los eritrocitos de carnero opsonizados y sin opsonizar para que sean fagocitados y poder ver la influencia tanto "in vivo" como "in vitro" del zinc.

La eritrofagocitosis se siguió revelándola por medio de un método colorimétrico que se basa en la reactividad de la hemoglobina como pseudoperoxidasa al actuar sobre el  $H_2O_2$  en presencia de 3-3' diaminobenzidina (DAB). La actividad de la pseudoperoxidasa es medida en un lector de ELISA a una longitud de onda determinada y con un filtro de referencia. (27)

Los resultados se analizaron e interpretaron con el método estadístico de ANOVA. Se observa que el zinc suplementado "in vivo" durante los períodos de gestación y lactancia incrementó la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales, mientras que en la postlactancia no presenta cambios. Por otro lado en la administración "in vitro" se observó un incremento en las etapas de gestación y lactancia, pero en la etapa de postlactancia se observó una disminución en la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales.

Estos resultados sugieren que en etapas tempranas la suplementación es beneficiosa, mientras que en la etapa de postlactancia cuando el sistema inmune ya se encuentra maduro, la fagocitosis o no presenta cambio o bien puede mostrar una pequeña toxicidad.

## INTRODUCCIÓN

Los estudios que se han realizado acerca de los efectos de elementos traza sobre las funciones del sistema inmunológico, incluyen a elementos como el manganeso, el fierro, el cobre y el zinc, este último es de particular importancia en el organismo ya que actúa como cofactor de enzimas, así como componente esencial de más de trescientas enzimas, entre las que se pueden citar las DNA y RNA polimerasas, la anhidrasa carbónica, la fosfatasa alcalina y la deshidrogenasa alcohólica. (8)

Cabe señalar que una excesiva ingesta de zinc puede ocasionar toxicidad para el organismo, generando una alteración en la respuesta inmunológica, entre otros problemas.

La desnutrición provoca deficiencia de nutrientes que incluyen proteínas, vitaminas, minerales y oligoelementos. De entre estos se ha podido observar que una deficiencia en la concentración de zinc durante el embarazo está relacionada al riesgo de aborto espontáneo y al retardo en el crecimiento fetal, entre otras alteraciones.

El zinc es un elemento que juega un importante papel para la ontogenia y funcionamiento del sistema inmunológico e incluso como inmunomodulador. Es un elemento traza fundamental para el crecimiento, desarrollo y diferenciación celular pero los mecanismos bioquímicos que relacionan al metal con estas etapas no son totalmente conocidos.

El mecanismo básico de acción del zinc en el crecimiento y en el desarrollo está íntimamente ligado a la estructura y a la acción de muchas enzimas, involucradas en diferentes procesos metabólicos por ejemplo: acción sobre la agudeza gustativa y el olfato, la acción sobre la replicación y diferenciación de células, etc. (8)(43)

## **El sistema inmunológico.**

Las barreras naturales de protección en contra de los microorganismos son la piel, las lagrimas, el sudor, las glándulas sebáceas, la saliva, las mucosas, los jugos gástrico y biliar, la flora habitual, etc., pero cuando los microorganismos traspasan estas barreras interviene el sistema inmunológico.

Las células del sistema inmunológico son los monocitos, macrófagos, polimorfonucleares, y linfocitos, los cuales intervienen para generar la respuesta inmune en contra de agentes internos y/o externos llamados antígenos. La respuesta inmune consta de tres fases: la primera fase es la de reconocimiento en donde son identificados los antígenos, la segunda fase es de activación, es decir, inducción de los linfocitos, en donde se activan eventos a consecuencia del reconocimiento específico del antígeno y por último la fase efectora en donde se requiere la participación de otras células linfoides, los anticuerpos activan el complemento y las citocinas incrementan la función fagocítica.

Durante las etapas de gestación, lactancia y postlactancia se han observado bajos niveles de zinc, por lo que se considera que si se suplementa este elemento en estos períodos del desarrollo, se puede reforzar el sistema inmunológico, pero se desconoce el efecto sobre la actividad de las células fagocíticas.

# ANTECEDENTES

## 1. GENERALIDADES

El zinc es un elemento traza fundamental para el crecimiento, desarrollo y diferenciación celular pero los mecanismos bioquímicos que relacionan al metal con estas etapas no son totalmente conocidos. (48)

El zinc parece tener una función puramente estructural. Debido a su capacidad por mantener unidas dos porciones disulfuro de una proteína, ya que este ion no puede ser reducido por la atmósfera del interior celular. Se ha confirmado la presencia de este metal en casos como:

- En los receptores de glucocorticoides los cuales contienen 9 cisteínas y 1 histidina con al menos 2 átomos de zinc.
- Factor de transcripción GAL 4 que contiene 6 cisteínas y 2 átomos de zinc. (8)

Una propiedad característica del Zn, pero no de otros metales como el Cu y el Fe, es la ausencia de reacciones de óxido-reducción que puedan llevar a la producción de radicales los cuales provocan la hidrólisis del DNA, RNA e igualmente a las proteínas del medio.

Las características químicas del Zn que permiten que tenga funciones útiles sobre los sistemas biológicos son:

- Tiene propiedades estereoquímicas selectivas
- Intercambia ligandos rápidamente
- No toma parte en reacciones de óxido-reducción
- A pH 7, es bastante soluble en agua. (8)

Sus características químicas lo hacen un elemento ideal en los procesos de catálisis ácido-base de muchas enzimas; las combinaciones del zinc con los aminoácidos histidina, aspartato y cisteína proporcionan sitios de coordinación abiertos al agua y los sustratos.

## **2. PROCESOS METABÓLICOS EN LOS QUE INTERVIENE.**

El zinc es importante para la estabilización y el funcionamiento de numerosas enzimas comprometidas con la síntesis proteica, el catabolismo de las proteínas, el metabolismo energético y la síntesis de DNA y RNA. (43).

El mecanismo básico de acción del zinc en el crecimiento y en el desarrollo esta íntimamente ligado a la estructura y a la acción de muchas enzimas, involucradas en diferentes procesos metabólicos, (8,29,43) por ejemplo:

- 1) Acción sobre la agudeza gustativa y el olfato, regulación del apetito y del consumo de alimento.
- 2) Acción sobre la replicación de células y diferenciación de osteoblastos y fibroblastos.
- 3) Efecto en la síntesis de la hormona del crecimiento (GH) y la acción de esta en el hígado.
- 4) Influencia en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. (9)(43)

Se ha encontrado que los iones de zinc y otros metales también pueden estimular la síntesis de DNA en los cultivos de linfocitos tanto en animales como en humanos. Se ha encontrado que tiene funciones reguladoras en asociación de factores tímicos, factor de crecimiento, la unión de insulina, de estrógenos a la membrana celular y actividad antioxidante. (19)

## **3. IMPORTANCIA EN EL DESARROLLO Y LA RELACIÓN CON LA DESNUTRICION**

La deficiencia de zinc tiene efectos nocivos sobre las células en replicación, la falta de zinc podría causar además otros efectos como anorexia, retardo del crecimiento, disfunción gastrointestinal con diarrea, hipogonodismo y trastornos en el sistema nervioso central. (13, 45)

Una deficiencia de zinc en los animales o humanos durante la gestación reduce las funciones inmunológicas como la fagocitosis, la quimiotaxis y la quimioquinesis, además de causar problemas como anemias, crecimiento retardado, hepatoesplenomegalia, etc. (23)

Se ha considerado que la deficiencia de zinc produce muchas alteraciones sobre el crecimiento y el desarrollo. La deficiencia del zinc tiene influencia sobre la anatomía de los tejidos linfoides, ya que debido a esta se pueden observar hipoplasia de timo, bazo, nódulos linfáticos, placas de Peyer y otros tejidos linfoides intestinales.

Se ha encontrado que la falta de zinc también afecta el número de linfocitos en animales de experimentación. En pacientes con deficiencia de zinc unida a una malnutrición proteico energética se ha visto una severa disminución en los niveles séricos de IgG. Además de que también se ha encontrado que provoca alteraciones sobre la distribución de inmunoglobulinas, es decir, disminución en los niveles de IgM, IgG2 e IgA y un marcado aumento en los niveles de IgG1. (10, 11)

Cuando hay una deficiencia de Zn, es evidente una disminución selectiva en el número de células cooperadoras CD4. Las pruebas "in vitro" han demostrado que estas células han disminuido marcadamente, su respuesta proliferativa a la fitohemaglutinina y a otros mitógenos. La habilidad de los linfocitos para producir IL-2 "in vitro" también se reduce. Esta disfunción puede ser debido al efecto directo de la deficiencia de zinc sobre los linfocitos. (11, 25)

El zinc parece modificar y estabilizar la membrana celular. El zinc puede también influir en el metabolismo del ácido nucleico alterando las uniones o enlaces de los histones F1 y F3 con el DNA, así como afectar la síntesis del RNA.

La alteración de la respuesta inmunológica por anemia de Zn puede deberse a cambios en la disponibilidad de sustancias individuales como: vitamina A, piridoxina, ácido fólico, y otras; inclusive la carencia de elementos traza, tales como: Fe, Cu, Se y Zn, por lo que son importantes las cantidades fisiológicas de estos elementos traza y vitaminas para el funcionamiento del sistema inmunológico. (12, 24, 38, 48)

#### 4. EFECTO DEL ZINC EN LA ETAPA PERINATAL

Una buena nutrición materna durante el embarazo es importante para el adecuado desarrollo y crecimiento del feto. Se considera que la concentración de zinc en los tejidos maternos influye en el peso del neonato durante el embarazo. (20, 42)

Conforme el embarazo va progresando, la concentración del zinc en el plasma materno disminuye gradualmente, mientras aumenta su nivel en los eritrocitos. Se ha sugerido que esta reducción de los niveles de zinc puede deberse a la disminución de la cantidad de albúmina o bien a la baja afinidad de la misma por una modificación en la estructura de esta proteína, o bien pudiese ser el resultado de una regulación hormonal, ya que los glucocorticoides, que aumentan la captación hepática del zinc y los estrógenos que aumentan la concentración en hígado, eritrocitos, útero y riñón, alteran la distribución del zinc en los tejidos y por esta razón la concentración de zinc se vea disminuida en el plasma. (21, 23)

Se han realizado estudios en animales de laboratorio, en donde se ha podido comprobar que la deficiencia de zinc puede causar trastornos tales como un desarrollo inadecuado de las glándulas mamarias y una disminución en su capacidad de lactación, una reducción de los niveles séricos de las inmonoglobulinas así como una alteración en la respuesta quimiotaxica y en la actividad fagocítica de los neutrófilos. (6, 13, 15, 17, 19, 26, 29, 32, 42, 46, 49)

La enfermedad congénita, acrodermatitis enteropática, es debida a la deficiencia de absorción de zinc en el intestino. Los infantes con esta enfermedad exhiben extensas lesiones mucocutáneas, defectos inmunológicos e infecciones frecuentes, las cuales conducen a una muerte temprana, afortunadamente un incremento en el consumo de zinc es suficiente para revertir las manifestaciones de esta enfermedad. Los aspectos inmunológicos por la deficiencia de zinc vuelven fácil y rápidamente a la normalidad por una administración oral de zinc en una clínica. (4, 37)



## 5. EL ZINC Y EL SISTEMA INMUNE

El zinc no es solamente un micronutriente esencial del cuerpo humano, tiene también una profunda importancia en el sistema inmunológico y otros mecanismos de defensa no especificados. Sin embargo los mecanismos moleculares por los cuales el zinc influye en el sistema inmune no están limitados a funciones enzimáticas.

El sistema inmune, a través de las interleucinas tiene influencia en la distribución del zinc en el cuerpo y en su metabolismo. No es sorprendente que el zinc sea de gran importancia en muchas reacciones bioquímicas, en linfocitos y leucocitos. (4)

El zinc influye tanto en la función de células fagocíticas como en linfocitos, debido a que una privación del zinc influye en la función de células T y la respuesta de células B se deprime moderadamente, la función fagocítica puede también ser alterada y observarse una monocitosis. (3, 16)

El zinc se requiere para la función hormonal del timo y la falta de estas hormonas es otra manifestación reversible de la deficiencia del Zn, la cual influye adversamente en los linfocitos T.

El sistema inmune consiste de mecanismos innatos y adquiridos que protegen a los huéspedes de los patógenos en el medio ambiente. Los mecanismos innatos funcionan independientes de la exposición previa de los huéspedes a los agentes infecciosos. Los mecanismos innatos incluyen barreras mecánicas, tales como la piel, y componentes celulares (macrófagos, neutrófilos y fagocitos). La influencia de zinc en barreras inmunes ha recibido poca atención aunque las características de la deficiencia de zinc incluyen lesiones de piel, lesiones gastrointestinales incluyendo cambios degenerativos en los enterocitos y alteraciones en las funciones pulmonares. (28)

El nexo entre este elemento y el sistema inmune, en especial en los mecanismos que interviene se explican más adelante.

## 6. CÉLULAS FAGOCÍTICAS

Existen dos tipos de células fagocíticas, los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y las células mononucleares (MN). Dentro de ambas poblaciones se reconocen subpoblaciones, no todas con igual actividad fagocítica. Los llamados fagocitos profesionales incluyen a los neutrófilos y a los macrófagos.(34) Mientras los primeros pasan de la médula ósea a la circulación en un estado maduro y terminal, los macrófagos lo hacen en un estado todavía inmaduro en la forma de monocitos.

Tanto los macrófagos como los neutrófilos destruyen a los microorganismos gracias a una combinación de enzimas, que funcionan de manera coordinada y son en general suficientes para destruir a la mayoría de los microorganismos que en un momento dado pudieran invadir al organismo.

Los macrófagos participan tanto en el procesamiento de los antígenos para ser presentados a las células T, como en la muerte de las células tumorales y en la regulación del desarrollo y la activación de los leucocitos, que incluyen basófilos, eosinófilos y células cebadas. (2, 34)

Aunque los leucocitos PMN y los monocitos/macrófagos comparten muchas características, como la presencia de los receptores para los anticuerpos y el fragmento activo del complemento (C3b) en sus membranas, su habilidad de fagocitar bacterias y partículas y provocar una muerte enzimática, hay diferencias importantes entre los dos tipos de células, entre las que se pueden citar, los PMN que son células errantes, que responden al factor C5a/C3a y liberan enzimas independientes de la fagocitosis, mientras que los monocitos/macrófagos son células residentes de tejidos, procesan antígenos, sintetizan y liberan prostaglandinas y liberan interleucinas. (35, 44)

El macrófago toma de manera continua material del medio externo por endocitosis, luego de lo cual desencadena la activación del "estallido respiratorio" condición en que se observa un incremento espectacular en el consumo de oxígeno y la activación de la oxidasa asociada a la membrana que depende,  $\text{NADP}^+$ . (7, 34, 36, 43)

## **6.1. POLIMORFONUCLEARES (PMN)**

Los PMN son más abundantes en la sangre, que los monocitos y por eso se consideran biológicamente la primera línea de defensa celular contra los microorganismos. Los neutrófilos tienen un diámetro de 12-15 micrómetros. (35, 36)

Dentro de los polimorfonucleares están incluidos los neutrófilos, los eosinófilos y los basófilos. Los neutrófilos, son el tipo principal de leucocitos polimorfonucleares por ser células móviles y se desconoce el sitio exacto de su destrucción. Debido a su corta vida los PMN no son tan eficientes como los macrófagos para eliminar a ciertos microorganismos. (35)

Los neutrófilos están especializados en la ingestión y muerte intracelular de diferentes bacterias, levaduras, hongos y virus. La mayor parte de los microorganismos pueden solo ser fagocitados después de ser opsonizados con anticuerpos y/o fragmentos del complemento. Los neutrófilos expresan en su superficie receptores específicos para IgG (Fcγ-R), y para el componente del complemento C3b (CR1) e iC3b (CR3)

## **6.2. MONONUCLEARES (MN).**

Los monocitos son células fagocíticas que pertenecen al sistema fagocítico mononuclear y residen en la circulación. Estas células tienen un diámetro de aproximadamente 10-18 micrómetros; la superficie posee microporosidades y una membrana ondulante. El citoplasma contiene un número pequeño de gránulos (lisosomas primarios), un complejo de Golgi, retículo endoplásmico rústico y mitocondrias, el núcleo es dentado o reniforme (en forma de riñón). (33)

Los monocitos terminan su proceso de maduración en los tejidos, en donde se establecen recibiendo diferentes nombres según el tejido de residencia: células de Kúpffer en el hígado, macrófagos alveolares en el pulmón, células de la microglía en el sistema nervioso, macrófagos peritoneales en la cavidad abdominal, etc.(33, 43)

Una importante característica distinguible en estas células es la habilidad de los monocitos/macrófagos de participar en mecanismos inmunorreguladores como son el procesamiento de antígenos y la secreción de interleucinas, características no compartidas por los leucocitos PMN.

### 6.3. MARCADORES Y CITOCINAS EN MACROFAGOS

Las inmunoglobulinas unidas específicamente con antígenos facilitan su destrucción. Las inmunoglobulinas son heterogéneas y tienen diferente peso molecular y diferentes propiedades funcionales. Hay 5 clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Todos los anticuerpos están caracterizados por 4 cadenas de polipeptidos ligados por enlaces de disulfuros los cuales varían de posición para cada Ig. Dos cadenas conocidas como cadenas ligeras tienen peso molecular de 22 000 aproximadamente, mientras que las otras dos cadenas, llamadas cadenas pesadas tienen pesos moleculares de 55 000 aproximadamente. En la porción N de cada cadena de polipeptidos una secuencia variable de aminoácidos dicta las propiedades de la unión antígeno de la inmunoglobulina. (28)

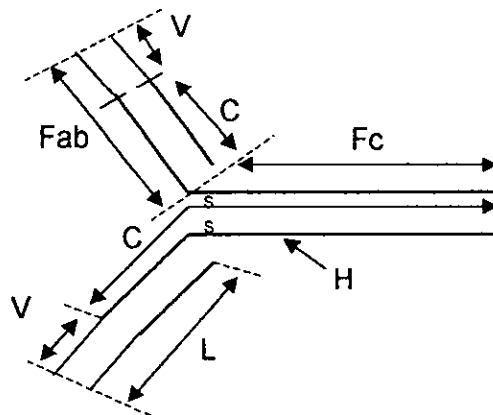


Figura 1. Estructura general de las Inmunoglobulinas: Fab = la especificidad de la Ig ó Ac, Fc = fracción cristalina y es en donde radica la actividad ó propiedad biológica, H = cadena pesada, L = cadena ligera, C = región constante de la cadena, V = región variable de la cadena y es la encargada de reconocer al Ag.

Los macrófagos cuentan al menos con cuatro clases de receptores para la fracción cristalina (Fc) de las inmunoglobulinas. Uno de los receptores se une a los monómeros o complejos de IgG (IgG1 e IgG3 del humano, IgG2a del ratón y la IgG2 del cobayo). (1) Un segundo tipo de receptor para Fc se fija y actúa como mediador en la endocitosis de los complejos antígeno-anticuerpo o de los agregados de las subclases IgG (IgG2 e IgG4 en el humano, IgG1 e IgG2b en el ratón). El tercer tipo de receptor Fc específico se une a la IgG3 en el ratón. Los macrófagos tienen también un receptor (FcER) que se une específicamente a la IgE. (40, 48)

Los receptores para el complemento son independientes de los receptores para Fc. Se consideran tres receptores del complemento, uno específico para C3b y otro para C3d y por último para C5a que es quimiotáctico y que probablemente se exprese también en los granulocitos.

Los macrófagos también tienen receptores para citocinas, las cuales intervienen en la activación del propio macrófago y que regulan la proliferación de estas células. Se han demostrado en los macrófagos la presencia de receptores para insulina, trombina, complejos  $\alpha$ 2-macroglobulina-proteínasa, lactoferrina, transferrina, fibrina/fibrinógeno, fibronectina y receptores para lipoproteínas normales y alteradas.

Muchos microorganismos pueden ser fagocitados después de la opsonización con anticuerpos específicos y/o fragmentos del complemento. (35, 43). Los anticuerpos se unen a la superficie de los microorganismos que van a ser opsonizados ya que directamente los fagocitos se unen al receptor de Fc o indirectamente por la habilidad de activar la cascada del complemento y así causar los depósitos de los factores del complemento sobre el microorganismo. Estos depósitos del complemento principalmente C3b e iC3b, se unen correspondientemente a los receptores CR1 y CR3 presentes en los fagocitos y promueven la fagocitosis. (1)

En los macrófagos se han identificado más de 50 productos de secreción los cuales se consideran tan importantes en su interacción con el ambiente extracelular como lo es en su función de células fagocíticas. Algunos de los productos de secreción de los macrófagos son: (5, 15, 40, 46)

a) Proteinasas inespecíficas tales como el activador del plasminógeno, elastasa dependiente de metal, colagenasas, proteinasa citolítica, otras enzimas como arginasa, lisozima, lipoproteinlipasa, hidrolasas ácidas entre las que se pueden mencionar fosfatasas y lipasas entre otras.

b) Proteínas plasmáticas como  $\alpha$ 2-macroglobulina, inhibidor  $\alpha$ 1-proteinasa, inhibidor tisular de metaloproteinasas, fibronectina, transcobalamina II, apolipoproteína E, proteínas de la coagulación (tromboplastina tisular, factores V, VII, IX y X) componentes del complemento (C1, C2, C3, C4, C5, properdina, factor B, D, I, H).

c) Metabolitos reactivos de oxígeno como el anión superóxido, peróxido de hidrógeno y otros.

d) Lípidos bioactivos entre los que mencionaremos prostaglandina E<sub>2</sub>, 6-cetoprostaglandina F<sub>1</sub> $\alpha$ , tromboxano B<sub>2</sub>, leucotrieno C, ácido 12-hidroxiicosatetranoico y otros.

e) Factores que regulan las funciones celulares como factor de la angiogénesis, interferón (INF), factores que promueven la proliferación de: fibroblastos, células endoteliales, células T y B, y precursores de la serie mieloide, factores que inhiben la proliferación de: células tumorales y *L. monocytogenes* (29), eritropoyetina e interleucina-1.

f) Metabolitos de nucleótidos como AMPc, timidina, uracilo y ácido úrico.

El macrófago produce interleucina-1 (IL-1) una citocina que actúa en parte de la activación de células T cooperadoras, aumentando la secreción de IL-2 e IL-3 en células T. Otras sustancias secretadas por los macrófagos son la IL-6, IL-8, factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), y las que regulan la función o crecimiento de otras células. (32, 46)

La IL-1 aumenta el efecto catabólico del factor de necrosis tumoral (TNF). En realidad, la IL-1 y el TNF actúan en varios sistemas celulares, además, el efecto combinado de estas dos citocinas es mayor que cada una por sí sola. (5)

Este sinergismo de la IL-1 y TNF se ha observado sobre una gran variedad de tejidos, como en células pituitarias, hueso, endotelio vascular, fibroblastos, piel y en los islotes de Langerhans. En varios estados fisiológicos específicamente en la generación de hipotensión, la IL-1 y TNF son altamente sinérgicos. (13, 18)

## **7. PARTICIPACION DEL ZINC EN ESTOS PROCESOS.**

La combinación de disfunciones en los mecanismos de defensa de los huéspedes los cuales incluyen el sistema inmune, monocitos/macrófagos, los granulocitos y el pobre mantenimiento de las barreras anatómicas, hacen que por deficiencia de Zn los huéspedes sean extremadamente susceptibles a infecciones mortales y que se incremente la severidad de otras infecciones que ocurran. (4)

La inducción de citocinas por zinc es causada por la interacción directa del zinc con los monocitos, En contraste la influencia estimulativa del zinc sobre células T representa un efecto directo vía liberación de IL-1 por los monocitos y contacto célula-célula. La importancia clínica de estas observaciones es soportada por estudios que muestran un efecto inhibitor en células T "in vitro" después de la suplementación de altas dosis de zinc "in vivo". (47)

Se ha sugerido que el zinc actúa primariamente sobre monocitos, induciendo la secreción de monocinas y que la actividad de las células T representan un efecto secundario en la cascada de las citocinas. (47)

La señal de IL-1 también estimula células pre-B y la expansión clonal de células B maduras las cuales producirán anticuerpos específicos para el antígeno. La IL-1 redistribuye el zinc en el plasma, hígado, médula ósea y timo. La reducción plasmática de zinc puede ser crítica para la activación fagocítica celular.

El efecto de la IL-1 es una rápida redistribución de zinc del conjunto del plasma hacia el hígado, médula ósea y el timo; la reducción de zinc en el plasma puede ser crítica para la activación de células fagocíticas. Mientras que la estimulación de zinc realizada por timo y médula ósea sugiere una necesidad crítica del elemento durante

la proliferación de células T y B. La producción y/o acción de algunas citocinas se piensa que dependen del zinc, por ejemplo: la producción y/o unión de membrana de IL-1, IL-2 e interferón pueden depender del zinc. (5, 18, 17, 28, 31)

## **8. FAGOCITOSIS**

La fagocitosis de la mayoría de las partículas ya sean infecciosas o inertes induce cambios metabólicos oxidativos y no oxidativos en las células fagocíticas que están relacionadas con su actividad microbicida. (43)

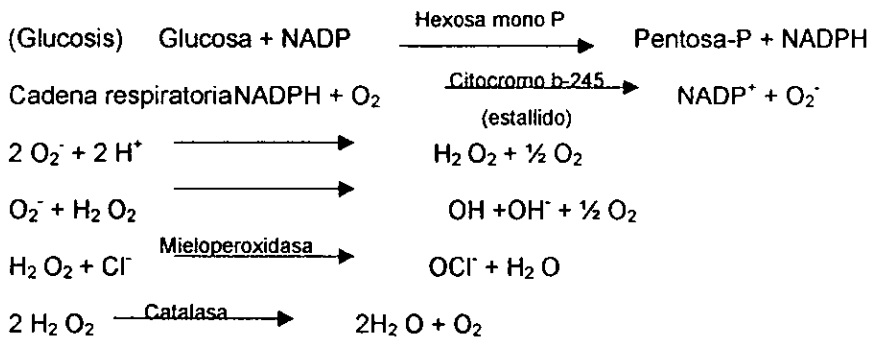
El evento que inicia la actividad fagocítica es la quimiotaxis, proceso en el que las células fagocíticas son atraídas al sitio de la infección, las sustancias quimiotácticas pueden ser factores derivados del suero, como la anafilatoxina C5a, que es liberada como consecuencia de la activación del complemento (C) por antígenos (Ag) o por complejos antígeno-anticuerpo (Ag-Ac).

Los procesos de fagocitosis pueden estar divididos en una serie de etapas:

- 1.- Unión de partículas opsonizadas a la superficie del fagocito. La opsonización sirve para poner en evidencia un ligando para la unión de partículas a receptores específicos en la superficie de los monocitos. Otras células pueden también unirse por azúcares en la superficie celular, a través del receptor de la lectina en monocitos.
- 2.- Unión de las partículas a la superficie celular que genera una señal que promueve los procesos de internalización.
- 3.- La célula fagocítica forma un pseudópodo para internalizar a la partícula extraña formándose las vesículas fagocíticas o fagosomas, que se dirigen hacia la zona perinuclear, guiados por los microtúbulos.
- 4.- Los pseudópodos de las células avanzan gracias al ensamble de filamentos de actina que alcanzan la membrana y forman una red en los pseudópodos. Los pseudópodos se adhieren a la partícula por interacción del ligando con los receptores de la superficie de la célula este proceso es llamado mecanismo "cremallera".



5.- Cuando se unen las partículas que serán fagocitadas a los receptores de la membrana plasmática se inicia lo que se conoce como el "estallido respiratorio".



6.- Cuando se completa la fagocitosis de la partícula esta reside en el citoplasma en una vacuola la cual esta formada por la membrana celular invertida y un fagosoma.

7.- Enseguida se fusiona el lisosoma con el fagosoma y las enzimas lisosomales son liberadas en el fagosoma y entran en contacto con las partículas fagocitadas. (36,41,43)

## 9. TOXICIDAD DEL ZINC

Cada micronutriente al parecer tiene un rango superior e inferior óptimo de función inmune. Una toma diaria de grandes cantidades de zinc por tiempo prolongado, puede tener efectos degenerativos y éstos se han asociado con alteraciones en las funciones de linfocitos y polimorfonucleares.

Ahora debemos poner un poco de atención sobre las propiedades tóxicas del zinc como sucede cuando se inhalan los óxidos de zinc de las fundidoras de metal donde se presenta una severa contaminación en el medio ambiente donde se encuentran.

Si bien se ha estudiado mucho sobre las deficiencias del zinc y sus consecuencias, también se deben mencionar las posibles causas que puede generar el ingerir zinc. Diversos textos mencionan que el zinc es relativamente no tóxico, se ha podido

comprobar que existen individuos animales y humanos que toleran la ingestión de cantidades altas de zinc tomado en forma oral. Sin embargo, existen manifestaciones sintomáticas claras de toxicidad como náuseas, vómito, dolor epigástrico, letargo y fatiga que pueden ocurrir al tomar cantidades extremadamente altas de zinc. (20)(47)

Se tiene conocimiento de toxicidad por el Zn al ingerir alimentos que se encontraban en contenedores galvanizados. Productos como alimentos y bebidas que son ácidos por naturaleza y en largos períodos de almacenamiento, ocasionan que se filtre el zinc de la película del galvanizado provocando manifestaciones tóxicas. (20)

Se considera que una ración recomendada de zinc es de 15 mg de Zn/día excepto en mujeres embarazadas y durante la lactancia. El ingerir entre 100-300 mg de Zn/día puede ayudar en el tratamiento de varios problemas, pero si el tratamiento es muy prolongado, es decir por más de 6 semanas, se presenta una deficiencia de cobre ocasionando una hipocupremia, anemia, leucopenia y neutropenia. El nivel de cobre se restaura al cesar la ingestión de zinc y administrar pequeñas cantidades de cobre. (24, 48)

## ANTECEDENTES DEL PROYECTO

Muchos de los estudios con respecto al zinc que se han realizado se contradicen en cuanto a la administración "in vivo" e "in vitro" del mismo, por lo que resulta interesante constatar el efecto de este metal. (14, 19, 30, 39, 46)

Debido a su posible participación en la respuesta inmunológica se han realizado varios experimentos en el laboratorio de Investigación en Inmunología en el sentido de encontrar resultados que ayuden a ampliar el conocimiento actual sobre la influencia de este metal en diferentes aspectos de la respuesta inmune.

Dentro de las investigaciones efectuadas se evaluó el efecto que provoca la administración de dosis moderadas de zinc sobre la función inmunológica, particularmente inmunidad celular durante las etapas de gestación, lactancia y destete. (21, 23) Se usaron estas etapas por que en los estudios que se han realizado durante el embarazo y la lactancia se ha observado que hay una disminución fisiológica de los niveles de zinc en las madres. (11)

Los resultados fueron muy interesantes y sugieren que administrando este metal "in vivo" y añadido "in vitro", en dosis adecuadas en tiempos controlados del metal parecen restaurar los trastornos presentados por inmunodeficiencias. Los resultados sugieren que la respuesta inmunológica es más susceptible a una manipulación durante la gestación que posteriormente cuando se ha desarrollado la respuesta inmunológica. Además de que dosis elevadas con tratamientos prolongados pueden ser tóxicos para el organismo. Por otro lado se encontró que el zinc "in vitro" adicionado a los cultivos de linfocitos eleva la respuesta proliferativa, es decir, actúa como mitogeno. Como puede verse estos resultados son controvertidos y hacen falta otros estudios para aclarar estas acciones.

En vista de que los estudios con zinc realizados han sido dirigidos en términos generales a la respuesta de linfocitos y en la actualidad se ha visto que una de las células más susceptibles a la carencia de zinc es el macrófago por lo que se ha decidido trabajar con los macrófagos y determinar el efecto del zinc sobre su función fagocítica, usando la técnica de eritrofagocitosis propuesta por Jungi, (27) que

consiste en: Un ensayo espectrofotométrico que permite evaluar la fagocitosis de eritrocitos por las células mononucleares.

Este ensayo se basa en la reactividad de la hemoglobina como pseudoperoxidasa al actuar sobre el  $H_2O_2$  en presencia de 3-3' diaminobenzidina (DAB).

El ensayo se realiza en una placa donde se colocan 100  $\mu$ l de suspensión de células y después de una fase de adherencia se lava con solución amortiguadora de fosfatos. A los pozos que contienen los fagocitos adheridos y medio de cultivo, se añaden una suspensión de eritrocitos de carnero en PBS los cuales han sido opsonizados con anticuerpos IgG en concentración subaglutinante, se incuban las placas en cámara húmeda a 37 °C, después los eritrocitos no ingeridos se retiran mediante un choque hipotónico y lavados, la placa se lava nuevamente con PBS y se agrega SDS y finalmente se agrega el sustrato (DAB/ $H_2O_2$ ) y la placa se lee a 490 nm. (27)

## **OBJETIVOS**

Observar el efecto de la suplementación con zinc sobre la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales durante el periodo perinatal de ratones BALB/c.

Aplicar un método sensible y rápido que permita la determinación de la función fagocítica mediante un sistema colorimétrico.

Estudiar el comportamiento de los macrófagos murinos en presencia de zinc "in vivo" e "in vitro", y comparar los resultados.

## **HIPÓTESIS:**

La suplementación con zinc a ratones en las etapas de gestación y lactancia y en la postlactancia, incrementará la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales.

## **OBJETIVOS**

Observar el efecto de la suplementación con zinc sobre la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales durante el periodo perinatal de ratones BALB/c.

Aplicar un método sensible y rápido que permita la determinación de la función fagocítica mediante un sistema colorimétrico.

Estudiar el comportamiento de los macrófagos murinos en presencia de zinc "in vivo" e "in vitro", y comparar los resultados.

## **HIPÓTESIS:**

La suplementación con zinc a ratones en las etapas de gestación y lactancia y en la postlactancia, incrementará la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### DISEÑO EXPERIMENTAL:

ANIMALES: ratones cepa BALB/cAnN los cuales se alimentaron y se cuidaron en el bioterio de la Facultad de Química.

El modelo experimental consistió en administrar zinc "in vivo" por medio del agua de bebida, usando acetato de zinc (Mallinckrodt, Kentucky USA No. cat. 8740-03), y /o zinc "in vitro".

Los animales se dividieron en cuatro grupos: el grupo I y el grupo III recibieron zinc, como suplementación durante 21 y 42 días de nacimiento respectivamente. Los grupos II y IV no recibieron zinc. Todos ellos consistían de 30 animales, no se hizo distinción entre hembras y machos.

Los animales se aparearon un macho con dos hembras, se les controló el período de día noche, la temperatura y la humedad, así como el alimento del cual se conocía la cantidad de zinc que tenía y el agua de bebida, cuando las hembras se observaban gordas el macho se sacrificaba, y las hembras eran separadas, para poder dejarles seis o siete crías cuando dieran a luz, se colocaba una etiqueta en la que se anotaba la fecha en que se colocó con el macho y posteriormente la fecha en la que tenía a sus crías, a partir de esta fecha se consideraban 21 días y se seleccionaban cuando menos tres o cuatro ratones para trabajar en ese momento, la madre se sacrificaba y los ratones restantes se dejan para trabajar a los 42 días de la fecha de nacimiento. (los 21 y 42 días son aproximados ya que en ocasiones se trabajaban hasta de 23 y 44 días.)

Para el trabajo experimental se anotaba el peso de los animales, el sexo, la edad y se clasificaban en los grupos correspondientes, grupo I los ratones que se trabajaban a los 21 días de nacidos y que habían recibido zinc "in vivo", en el grupo II los que no recibieron zinc pero que tenían 21 días de nacidos. En el grupo III los que recibieron zinc y con 42 días de nacimiento y en el grupo IV los de 42 días pero que no recibieron zinc.

Además del experimento de observar la función de los macrófagos con el zinc "in vivo" paralelamente se realizó una placa en la que se adicionó zinc "in vitro" en el momento de realizar la fagocitosis.

## TÉCNICA DE ERITROFAGOCITOSIS

### 1.- Obtención de macrófagos.

Para la obtención de los macrófagos se utilizaron ratones hembras y machos divididos en cuatro grupos; el grupo I de 21 días de nacidos y el grupo III de 42 días de nacidos los cuales recibieron 500 mg/L de zinc y el grupo II de 21 días de nacidos y el grupo IV de 42 días de nacidos los cuales recibieron 0 mg/L de zinc, para evaluar la función fagocítica de sus macrófagos peritoneales. (22)

Se sacrificaron los animales por dislocación cervical, y se les retiró la piel del área peritoneal, se aplicaron con una jeringa 4 -5 ml de medio RPMI 1640 (Hyclone, Utah USA B-0304-Ax) a 37 ° C, el medio se dejó en el peritoneo por unos minutos dando pequeños masajes.

Después de transcurrido el tiempo se procedió a extraer el medio que contenía a los macrófagos, y se colocó en tubos de ensaye que debieron estar en baño de hielo para evitar que los macrófagos se adhieran a las paredes del tubo.

Esos tubos se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a 4° C, el sedimento se resuspendió en medio RPMI 1640 a 4° C y se repitió la centrifugación en las mismas condiciones para lavar las células 1 ó 2 veces.

Al final se resuspendieron los macrófagos en el volumen necesario del medio RPMI 1640 suplementado (con 10% de suero fetal bovino (Sigma, Chem. USA No. cat F-2442), L-glutamina 2 mM (Microlab, Méx.), aminoácidos no esenciales al 0.05% (Microlab, Méx.), piruvato de sodio al 0.05% (Microlab, Méx.), penicilina y estreptomycinina al 0.1% (HyClone, Utah USA No. cat B-3001-D-P)), para ajustar la concentración de células a  $1 \times 10^5$  células / ml, y se mantuvo en baño de hielo.

### 2.- Adhesión de los macrófagos.

Se utilizaron placas de poliestireno con tiras de 8 pozos (COSTAR cat 2580). Se ocuparon 12 pozos con células de cada ratón colocando en cada pozo 100  $\mu$ l de la suspensión que contiene  $10^5$  células.

La suspensión se incubó por 24 horas a 37° C en presencia del 5% de CO<sub>2</sub>.



Después de la incubación se lavaron las placas 2 ó 3 veces con amortiguador salino de fosfatos (PBS) de pH 7.2 y 0.01M.

Después se les colocaron 50  $\mu$ l de medio RPMI suplementado.

### **3.- Fagocitosis.**

Se preparó una suspensión de eritrocitos de carnero al 1% en PBS y una suspensión de eritrocitos de carnero opsonizados al 1% en la misma solución de PBS. Estos últimos fueron preparados haciendo reaccionar los eritrocitos de carnero con anticuerpos anti-eritrocito de carnero obtenidos en conejo, en una concentración subaglutinante (1:256), por incubación en baño maria a 37° C durante 10 minutos, siendo posteriormente lavados y ajustados al 1% de la suspensión.

A las células adheridas a la placa en un volumen de 50  $\mu$ l de medio RPMI 1640, se le agregaron a 4 pozos 30  $\mu$ l de PBS, a otros 4 pozos 30  $\mu$ l de la suspensión de eritrocitos de camero sin opsonizar y por último a 4 pozos más 30  $\mu$ l de la suspensión de eritrocitos de carnero opsonizados para que se realizara la fagocitosis.

Se incubó la placa a 37° C por 90 minutos en presencia de CO<sub>2</sub>, después de lo cual se dio un choque hipotónico con una solución de PBS/H<sub>2</sub>O (3:7), y se lavó la placa de 2 a 3 veces con PBS sin diluir.

Finalmente se agregaron 100  $\mu$ l de una solución de duodecil sulfato de sodio (SDS) (Sigma, Chem. USA, No cat L-4509), al 0.3 % en PBS y la placa se agitó durante 10 minutos.

Se colocaron 150  $\mu$ l del sustrato (2 mg de 3-3' diaminobencidina (Sigma, Chem, USA, No cat D 5637) y 20  $\mu$ l de peróxido de hidrógeno al 33 % (Mallinckrodt No. cat. 5240 )), en 5 ml de PBS. La reacción colorimétrica se produce por la capacidad de la pseudoperoxidasa de la hemoglobina al actuar sobre el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en presencia de la diaminobencidina (DAB). Las placas se colocaron en la oscuridad y 45 minutos después se midió la absorbancia en el lector de microplacas (BECKMAN Biomeck 1000) a una longitud de onda de 490 ó 540 nm con filtros de referencia de 660 ó 690 respectivamente.

Para determinar el número de eritrocitos fagocitados se realizó una curva de la siguiente manera:

Se colocaron en la placa de poliestireno por duplicado, 5  $\mu$ l de varias diluciones de la suspensión al 1% de eritrocitos de carnero. También se colocaron por duplicado 5  $\mu$ l de la suspensión para los controles positivo (1:2) y negativo (1:32) que son los puntos máximo y mínimo de absorbancia, permisibles para el método y enseguida se adicionaron a cada pozo 25  $\mu$ l de PBS, 100  $\mu$ l de SDS y 150  $\mu$ l de sustrato.

#### **4.- Efecto del zinc “in vitro” sobre la adhesión de los macrófagos.**

Se estudio el efecto del zinc “in vitro” sobre la adhesión de los macrófagos. Se midió la adhesión de macrófagos tal como se describió en la sección 3.

Para el efecto sobre la fagocitosis se utilizaron las mismas condiciones excepto que, además de las suspensiones de eritrocitos de carnero al 1%, se agregaron 20  $\mu$ l de cloruro de zinc (Merck No. cat. 8816 ), para obtener una concentración final de 0.1 mM.

# RESULTADOS Y DISCUSION

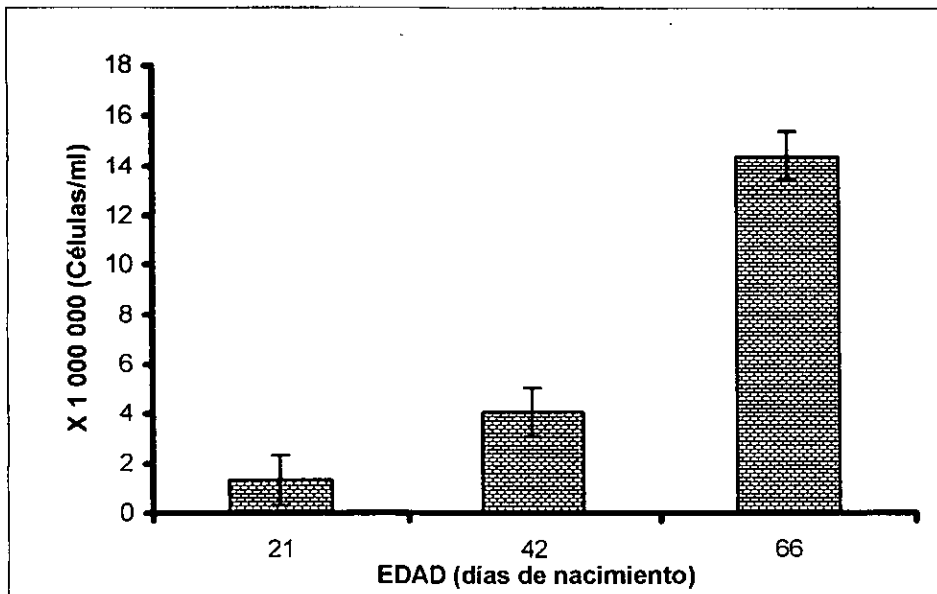
## 1) ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE FAGOCITOSIS UTILIZANDO ERITROCITOS DE CARNERO

### Obtención de células del peritoneo según la edad del ratón

La cantidad de células del área peritoneal, de animales de 21, 42 y 66 días de nacidos obtenidas están representadas en la siguiente tabla.

Edad (días de nacimiento)	promedio +/- desv. est. (células/ml)	n
21	1.325 +/- 0.28 X 10 <sup>6</sup>	28
42	4.064 +/- 0.22 X 10 <sup>6</sup>	26
66	14.435 +/- 0.48 X 10 <sup>6</sup>	11

Los resultados obtenidos muestran que la cantidad de células obtenidas es mayor cuando el ratón tiene mayor edad. Están representados en la gráfica siguiente.



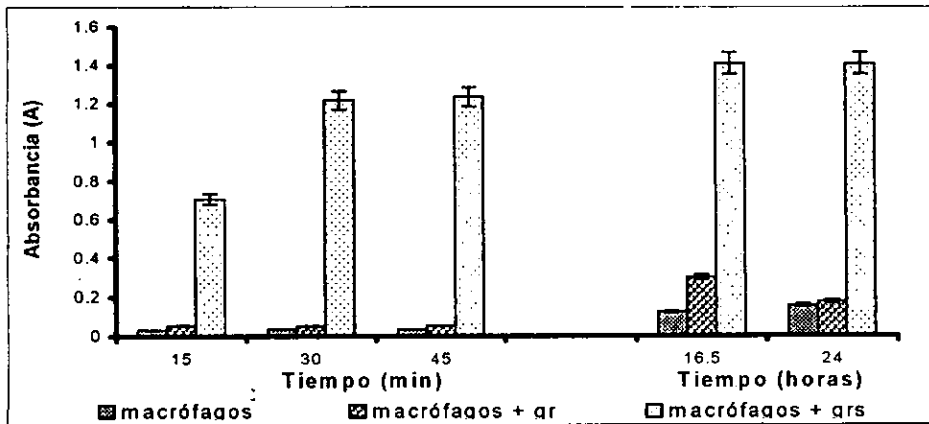
### Determinación de la absorbancia obtenida con las células adheridas en las placas de poliestireno

Para esto se utilizan células de animales adultos de 66 días de nacidos, para poder observar cual es su capacidad de adherencia sobre las placas. Donde se puede observar que existe una mayor absorbancia en donde los eritrocitos se han opsonizado. A una longitud de onda de 490 nm.

	Absorbancia promedio +/- desv. est.	n
pozos vacíos	0.054 +/- 0.004	8
Macrófagos	0.065 +/- 0.002	8
macrófagos y eritrocitos no opsonizados	0.070 +/- 0.007	8
macrófagos y eritrocitos opsonizados	1.681 +/- 0.191	8

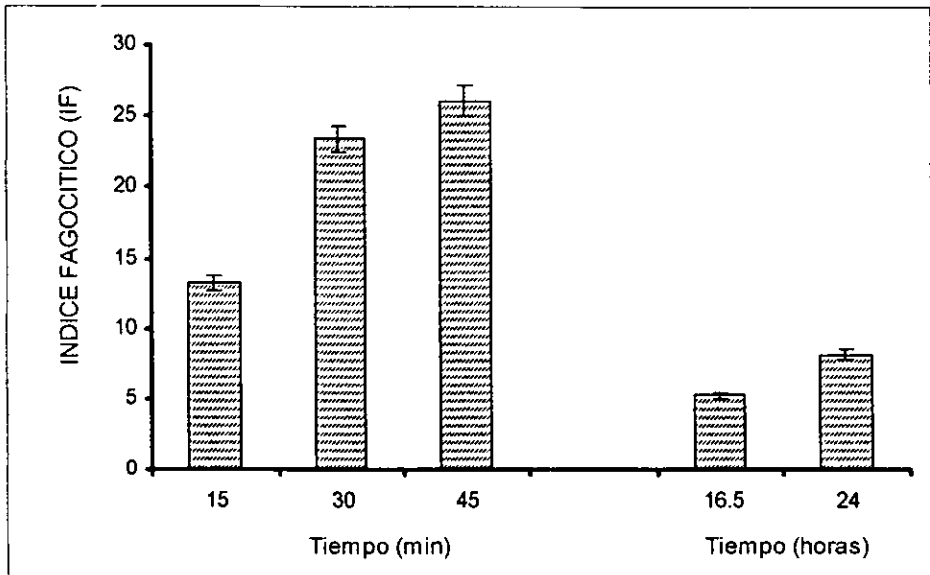
### Determinación del tiempo óptimo de lectura espectrofotométrica.

Se utilizaron animales de 66 días de nacidos. Obteniéndose los siguientes resultados en absorbancia, donde podemos comparar a los diferentes tiempos las absorbancias, medidas a 490 nm. En la determinación del tiempo óptimo de lectura se realizaron lecturas de absorbancia a los 15, 30 y 45 minutos, además a las 16.5 y 24 hrs. Los resultados presentados en la gráfica no permiten determinar claramente el tiempo óptimo de lectura. Están representados por la siguiente gráfica, en donde gr son glóbulos rojos y grs es glóbulos rojos opsonizados.



Se realizó el cálculo del índice fagocítico (IF), cuyos resultados se presentan en la siguiente gráfica, con lo que podemos determinar que el tiempo óptimo se encuentra entre los 30 y 45 minutos.

La siguiente gráfica presenta los índices fagocíticos obtenidos en la determinación del tiempo óptimo



Con esto se tomó la decisión para el tiempo óptimo de lectura, y observando que este se encuentra entre los 30 y 45 minutos en lo que respecta a la absorbancia. Pero al obtener los IF se observa que el índice más alto es a los 45 minutos. Dando por resultado que el tiempo óptimo de lectura es de 45 minutos.

## Determinación de la Capacidad Fagocítica

Los resultados se expresan como Índice Fagocítico (IF), el cálculo se realizó mediante la fórmula siguiente:

$$IF = \frac{\text{Absorbancia de macrófagos con eritrocitos de carnero opsonizados}}{\text{Absorbancia de macrófagos con eritrocitos de carnero sin opsonizar}}$$

	Absorbancia Promedio	Índice Fagocítico
macrófagos (A)	0.038*	
macrófagos y eritrocitos (B)	0.056*	
macrófagos y eritrocitos opsonizados (C)	1.347*	
índice fagocítico (C/B)		24.0
índice fagocítico (C/A)		35.6
índice fagocítico(B/A)		1.5

Los resultados muestran que las absorbancias promedio obtenidas en el ensayo de montaje y los posibles índices fagocíticos.

Así podemos ver como se representa la capacidad fagocítica. Con estos datos se observa que la absorbancia de la reacción de la hemoglobina como pseudoperoxidasa, de acuerdo con la técnica espectrofotométrica propuesta por Jungi (27) en donde el cálculo del índice fagocítico lo presenta en un rango entre 0.1 y 20, nosotros tenemos para la estandarización un cálculo promedio de 24, lo que permite utilizar la técnica en un modelo biológico.

## **2) USO DE LA TÉCNICA DE FAGOCITOSIS EN EL MODELO BIOLÓGICO**

Una gran parte de los datos aparecidos recientemente, apuntan al papel principal del macrófago como célula susceptible de ser modulada por variaciones en la concentración de zinc.

Se utilizó la técnica de eritrofagocitosis para evaluar la funcionalidad de los macrófagos peritoneales de ratones a los cuales se les administró previamente una solución de 500 mg/L de zinc como agua de bebida y/o zinc "in vitro" 0.1 mM, esa actividad se comparó con la mostrada por células obtenidas de un grupo control.

Para los resultados obtenidos en el modelo biológico se manejaron ratones de las etapas de gestación y lactancia (21 días de nacimiento) y postlactancia (42 días de nacimiento), ya que se desea saber como actúa el zinc sobre la capacidad fagocítica de los macrófagos peritoneales, principalmente en estas etapas. El zinc fue administrado en forma de acetato de zinc en el agua de bebida de uso diario.

### **Comparación de dos longitudes de onda.**

Con la finalidad de observar si hay diferencias significativas experimentales entre los resultados obtenidos, se valoraron 2 longitudes de onda (540 y 490 nm), los cuales se compararon para observar como se manifiesta la absorbancia de la DAB (3,3'-Diaminobenzidina) combinada con la Hb (hemoglobina) y el peróxido de hidrógeno, ya que en su espectro de absorción se pueden observar dos máximos.

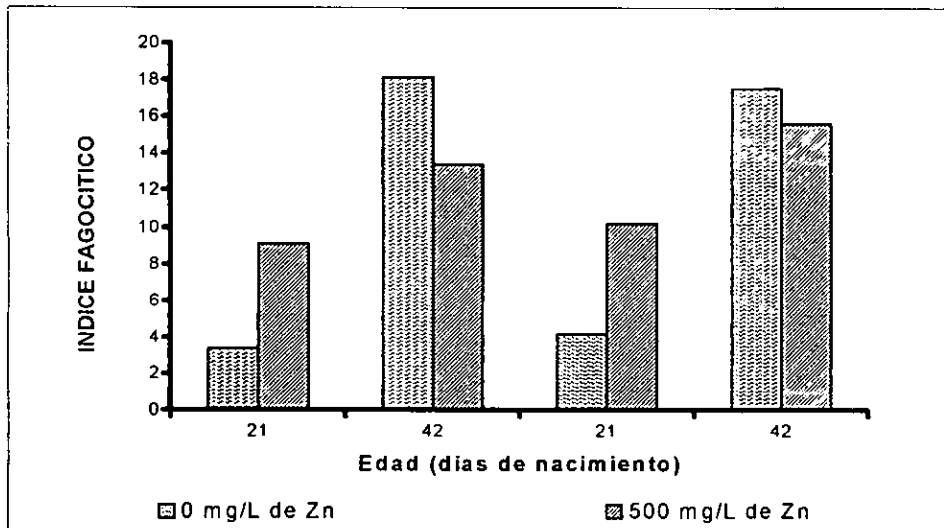
Los resultados muestran que durante la gestación y lactancia se incrementa el índice fagocítico de los animales a los cuales se les administro zinc, por otro lado durante la etapa de postlactancia se observa una disminución del índice fagocítico.

Después de observar que los resultados en ambas longitudes presentan una tendencia similar, y que no existe diferencia significativa entre una y otra longitud de onda, auxiliados en el cálculo estadístico de ANOVA se consideró trabajar a 490 nm únicamente para el zinc "in vitro".

Los resultados correspondientes a la administración de zinc "in vivo" se muestran en la tabla siguiente:

	21 DÍAS DE NACIMIENTO		42 DÍAS DE NACIMIENTO	
	0 mg/L Zn	500 mg/L Zn	0 mg/L Zn	500 mg/L Zn
(540/690nm)	3.4	9.1	18.1	13.4
(490/660nm)	4.2	10.2	17.5	15.6

Los valores promedio del índice fagocítico de la longitud de onda de 540 nm con un filtro de referencia de 690 nm, con una n = 30, son los representados a la izquierda de la gráfica. Y los valores promedio del índice fagocítico de la longitud de onda de 490 nm con un filtro de referencia de 660 nm. Se representan a la derecha de la gráfica siguiente:



Considerando la absorbancias los resultados muestran que a 490/660 nm se puede ver que al administrar del zinc durante la gestación y lactancia aumenta la actividad fagocítica, mientras que para el período de postlactancia, se observa un marcado



decremento. Esta es sin embargo si consideráramos el IF de Jungi (27) efectivamente veríamos que para gestación y lactancia existe un aumento, a diferencia de que en el período de postlactancia el efecto del zinc casi no es detectable, pero se observa un pequeño aumento. Este comportamiento se presenta tanto en las lecturas a 490/660, como a 540/690 nm.

En este estudio se encontró un incremento significativo de 4.2 a 10.2 en el índice fagocítico (IF) en los macrófagos peritoneales procedentes de ratones suplementados con 500 mg/mL de zinc, durante la gestación y la lactancia, grupo I con respecto al grupo II.

En el estudio también se demostró que el índice fagocítico de macrófagos de ratones no suplementados, mostró un incremento significativo ( $P=0.05$ ), que va de 4.2 en ratones de 21 días a 17.5 en ratones de 42 días de vida, lo que probablemente sea debido al desarrollo de las capacidades funcionales de estas células, atribuible a la edad.

Se observó que el IF cae en forma notoria si se prolonga el período de administración, lo que puede indicar una saturación de los mecanismos dependientes del zinc, en la respuesta fagocítica, grupo III con respecto al grupo IV.

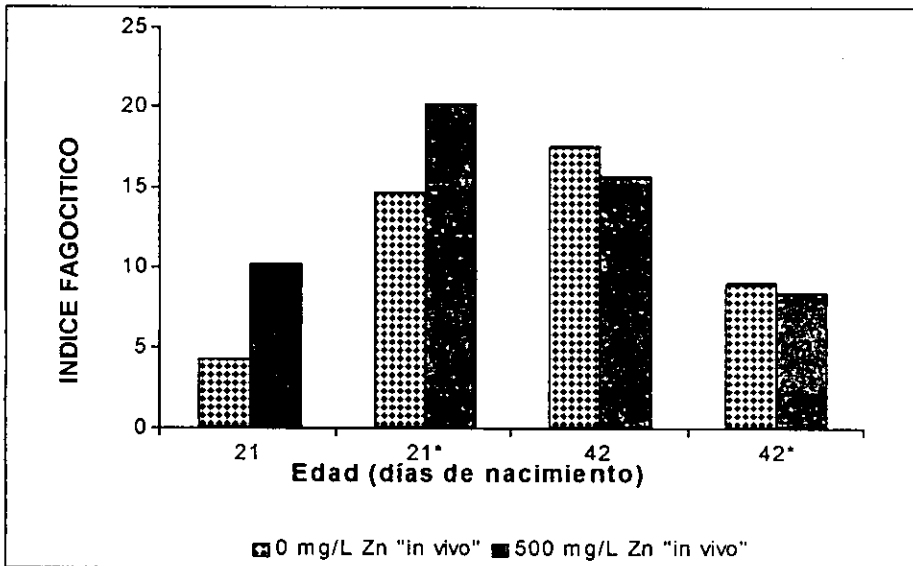
No obstante que se observa un aumento en los IF de los grupos I y III (10.2 a 15.6) pero este puede deberse más a la edad del ratón que a la suplementación de zinc.

### Efecto del Zn "in vitro"

Para medir el zinc "in vitro" se realizaron placas usando células de ratones a los cuales se les administro zinc "in vivo" y a sus controles los cuales no lo recibieron. Los resultados de la administración de zinc "in vitro". Se representan en la siguiente tabla. Se usó una longitud de onda de 490 nm con un filtro de referencia de 660 nm.

	21 DÍAS DE NACIMIENTO		42 DÍAS DE NACIMIENTO	
	0 mg/L Zn + 0.1 mM Zn	500 mg/L Zn + 0.1 mM Zn	0 mg/L Zn + 0.1 mM Zn	500 mg/L Zn + 0.1 mM Zn
Indice Fagocitico	14.6	20.1	9.0	8.4

La comparación del uso de la administración de zinc "in vivo" e "in vitro" se aprecia en la gráfica siguiente: Los resultados de Zn "in vitro" 0.1 mM (\*).



Quando se administra zinc "in vitro" en células de ratones de 21 días de nacidos se observa un aumento en la funcionalidad fagocitica, mientras que a los 42 días se observa una disminución en la capacidad fagocitica.

La exposición de los macrófagos al zinc "in vitro" produjo un incremento del 100% en su capacidad fagocítica, en los animales suplementados con 500 mg/mL, de 21 días de edad (grupo I). Este incremento es más notable en los animales del grupo II en que el incremento en el índice fagocítico ante el zinc "in vitro" es de aproximadamente 4 veces. ( de 4.2 a 14.6)

En los animales tratados del grupo III la acción del zinc "in vitro" produjo una inhibición de aproximadamente 54%, con respecto a los que no recibieron zinc "in vitro".

Por otra parte es notorio que en los animales del grupo IV el índice fagocítico se redujo en 51%, con zinc "in vitro", con respecto a los no expuestos al metal. Esto sugiere que en esta etapa, la cantidad fisiológica de zinc circulante no permite la acción mitogénica del metal sobre los macrófagos.

En los animales de esta edad suplementados con zinc desde el nacimiento (grupo III), el índice fagocítico cayó de 15.6 a 8.4, esto concuerda con observaciones anteriores en que la prolongación del suplemento, ya no solo produce una saturación sino que resulta tóxica.

La mayoría de los estudios realizados a la fecha han sido dirigidos a identificar las consecuencias de la deficiencia de zinc, (3,28) y coinciden en que la carencia de este elemento provoca alteraciones en la respuesta inmune tanto celular como humoral.

Muchos trabajos informan acerca de que el zinc es un elemento clave para el buen funcionamiento del sistema inmunológico, al estar involucrado en diversas funciones y componentes que son necesarios para una respuesta correcta como lo son; el funcionamiento celular, la metaloenzimas, la maduración tímica entre otras. (9, 25, 29)

Se ha observado que durante el embarazo (21,23) y la lactancia (11) existe una disminución fisiológica de los niveles de zinc en las madres, debido a que este metal y otros micronutrientes se requieren para el desarrollo del feto y la producción de leche.

## Análisis estadístico

Para determinar las diferencias significativas entre los grupos de estudio, los resultados se analizaron mediante la prueba estadística de ANOVA. Y se considera  $p < 0.05$  como significativa.

### Resultados de Zinc "in vivo"

Tabla 1. Los resultados para la longitud de 540 nm:

Fuente de variación	suma de cuadrados	grados de libertad	media de cuadrados	F	probabilidad
Edad	2865.541	1	2865.541	180.802	0.000
Dosis	1.680	1	1.680	0.106	0.745
edad-dosis	908.600	1	908.600	57.328	0.000
Error	1838.490	116	15.849		
Total	5614311	119			

Tabla 2. Los resultados para la longitud de 490 nm:

Fuente de variación	suma de cuadrados	grados de libertad	media de cuadrados	F	probabilidad
Edad	1320.704	1	1320.704	59.190	0.000
Dosis	64.274	1	64.274	2.881	0.095
edad-dosis	233.248	1	233.248	10.453	0.002
Error	1249.536	56	22.313		
Total	2867.762	59			

### Resultados de Zinc "in vitro"

Tabla 3. Los resultados para la longitud de 490 nm:

Fuente de variación	suma de cuadrados	grados de libertad	media de cuadrados	F	probabilidad
edad	2075.008	1	2075.008	195.014	0.000
dosis	133.985	1	133.985	12.592	0.001
edad-dosis	228.528	1	228.528	21.478	0.000
error	1234.275	116	10.640		
total	3671.796	119			

Resultados de la utilización de dos longitudes.

Tabla 4. Los resultados obtenidos:

Fuente de variación	suma de cuadrados	grados de libertad	media de cuadrados	F	probabilidad
edad	3669.779	1	3669.779	204.403	0.000
dosis	53.207	1	53.207	2.964	0.087
longitud	22.600	1	22.600	1.259	0.263
edad-dosis	892.395	1	892.395	49.706	0.000
edad-long.	1.521	1	1.521	0.085	0.771
dosis-long.	33.611	1	33.611	1.872	0.173
edad-dosis-long.	24.336	1	24.336	1.355	0.246
error	3088.026	172	17.954		
total	7785.475	179			

Resultados de Zn "in vivo" e "in vitro".

Tabla 5. Los resultados se manejaron como placa, considerando como 1 para Zn "in vivo" y 2 para Zn "in vitro":

Fuente de variación	suma de cuadrados	grados de libertad	media de cuadrados	F	probabilidad
edad	11.378	1	11.378	0.788	0.376
dosis	175.003	1	175.003	12.119	0.001
placa	38.678	1	38.678	2.678	0.104
edad-dosis	449.347	1	449.347	31.117	0.000
edad-placa	3132.900	1	3132.900	216.948	0.000
dosis-placa	0.019	1	0.019	0.001	0.971
edad-dosis-placa	14.003	1	14.003	0.970	0.326
error	2483.811	172	14.441		
total	6305.139	179			

Para poder concluir que existen diferencias significativas se considera que el valor de P obtenido deberá ser menor que 0.05, y en caso de ser mayor se concluye que no hay diferencias significativas.

## CONCLUSIONES

Este trabajo de investigación permite observar que el Zn administrado "in vivo" (500 mg/L) en las etapas de gestación y lactancia aumenta la actividad fagocítica de los macrófagos, mientras que la prolongación del suplemento a la etapa de postlactancia produce una ligera disminución de este incremento.

Al agregar Zn "in vitro" ( $10^{-4}$  M) además del Zn "in vivo" la fagocitosis de los macrófagos en las etapas de gestación y lactancia aumenta, tanto para los obtenidos del grupo que recibió zinc "in vivo" como para los que no lo hicieron, mientras que en la etapa de postlactancia la fagocitosis se ve marcadamente disminuida.

La metodología de eritrofagocitosis es reproducible, rápida y muy sensible, con las características suficientes para ser usada dentro de un modelo biológico.

Los resultados de esta tesis comprueban que el zinc es un elemento esencial en la respuesta inmune, provocando un incremento notable como en este caso, en la capacidad Fagocítica del macrófago, sin producir efectos secundarios en los animales suplementados.

## ANEXO I

### TÉCNICAS PARA EVALUAR LA FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS FAGOCÍTICAS

La evaluación de la función fagocítica es usada en los estudios de leucocitos PMN, los cuales son considerablemente más fáciles de separar en humanos que los monocitos o macrófagos. (44).

Entre las pruebas que permiten determinar un problema por defecto de la función fagocítica están:

#### a- Cuenta de leucocitos polimorfonucleares

Es la prueba más simple y una de las más importantes. Se realiza una cuenta de leucocitos, además se puede considerar que cuando la cuenta de neutrófilos es menor de  $1000/\text{mm}^3$  existe un alto riesgo de infección y cuando es menor de  $200/\text{mm}^3$  el paciente inevitablemente será infectado.

#### b- Adherencia

Para esta prueba sólo se realiza una medición por aglomeración de las células utilizando zymosan, C5a, fibras de lana-nylon o alguna otra substancia artificial.

#### c- Migración y quimiotaxis como prueba de movilidad

Esta prueba se realiza usando el principio de la cámara de Boyden en la cual se tienen dos compartimentos y en uno se colocan las células marcadas con  $^{51}\text{Cr}$  y en el otro un factor quimiotáctico como C5a o el tetrapeptido de f-met-leu-fen (formil-metionina-leucina-fenilalanina). Después de un tiempo, se mide el movimiento que tuvieron las células, contando cuantas pasaron de la parte superior a la parte inferior de la cámara de Boyden.

#### **d- Reconocimiento**

Se utiliza para ver el reconocimiento de las células hacia el Ag o el Ac, mediante el uso de partículas opsonizadas con Ag o Ac específicos para los receptores de los macrófagos y neutrófilos.

#### **e- Ingestión**

Se utilizan partículas de látex, eritrocitos, etc., los cuales son opsonizados, para posteriormente incubarlos con las células y entonces se lleve a cabo la ingestión, la cual nos permite determinar el índice fagocítico.

#### **f- Desgranulación**

Para medir la desgranulación se realiza una prueba de ingestión de partículas y se mide en el sobrenadante las sustancias liberadas por las células entre las cuales se encontrarían la mieloperoxidasa, lisosima,  $\beta$ - glucuronidasa, lactoferrina, etc.

#### **g- Estallido oxidativo.**

##### **1. - Quimioluminiscencia**

La quimioluminiscencia es un ensayo basado en la inestabilidad de los iones superóxido, la cual se puede medir directa o indirectamente al agregar luminol activado durante la disociación del superóxido.

##### **2. - Reducción de citocromo C**

Esta prueba se realiza usando el cambio de color del citocromo C por el superóxido, midiéndolo con un espectrofotómetro convencional.



### 3. - Reducción nitroazul de tetrazolio

Esta técnica está basada en el estímulo con lipopolisacárido y el azul de tetrazolio y luego se observan las células que se han coloreado debido a la reducción que realizan los lisosomas, pudiendo extraer del interior de las células el colorante con piridina y luego leerse en un espectrofotómetro. Otra variante, es sólo hacer una observación al microscopio de 100 células tomando una muestra en un portaobjetos y ver que porcentaje de ellas que se coloreó.

### 4. - Citometría de flujo

Este es un método muy costoso en el cual se utiliza la oxidación del diacetato 2',7'- diclorofluorescina (no fluorescente) el cual da por resultado la formación de l 2',7'- diclorofluoresceína (altamente fluorescente). En donde el superóxido es inducido con acetato miristato forbol o algún otro activador soluble de células, por último se mide la fluorescencia.

### **h- Muerte intracelular.**

Esta se basa en la habilidad que tienen estas células para matar a los microorganismos ingestados y se usa una variedad de bacteria y levaduras que están mezcladas con células en presencia de suero normal humano, después de un tiempo se mide el número de bacterias viables intracitoplásmicas por medio de un análisis bacteriológico. (36, 44)

## BIBLIOGRAFIA

1. Aase A., Michaelsen T E., *Opsonophagocytic activity induced by chimeric antibodies of the human IgG subclasses with or without help from complement*, **Scand J Immunol**, 1994, 39, 581-587.
2. Adams D O., Hamilton T A., *The cell biology of macrophages reactivation.*, **Ann Rev Immunol**, 1984, 2, 283-318.
3. Bach Jean-Francois, *The multi-faceted zinc dependency of the immune system*, **Immunol today**, 1981, 225-227.
4. Beisel R W., *Zinc and the immune system.*, **Encyclopedia of immunology**. Roitt (Ed). Academic Press., 1992., 1577-1578.
5. Bendtzen K., *Interleukin -1, interleukin-6, and tumor necrosis factor in infection, inflammation and immunity*, **Immunol Lett**, 1988, 19, 183
6. Blondiau C, Lagadec P., e tal., *Correlation between the capacity to activate macrophages in vitro and the antitumor activity in vivo of lipopolysaccharides from different bacterial species*, **Immunobiol**, 1994, 190, 243-254.
7. Bochner B S., e tal., *Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules*, **J. Exp. Med.**, 1991, 173, 1553-1556.
8. Brambila C E M, González V E., *Zinc: funcion e interaccion con las moléculas de los sistemas biológicos*, **Boletín de Bioquímica**, 1994, 13, 36-45.
9. Brandão-Neto J., etal *The essential role of zinc in growth*, **Nutr Res**, 1995, 15, 335-358.
10. Burch R E., Sullivan J F., *Clinical and Nutritional aspect of zinc deficiency and excess*, **Medical Clinics of North America**, 1976, 60, 675-683.
11. Camacho Cruz Alejandro, *Respuesta inmunológica "in vitro" en presencia de zinc*, Facultad de Química. UNAM, México, 1994, TESIS
12. Chandra R K, *Effect of vitamin and trace-element supplementation on immune responses and infection in elderly subjects*, **Lancet**, 1992, 340, 1124-1127.

13. Chandra R K., Serushago B A., *Alteration in spleen cellularity and cytokine production in zinc-deficient mice challenged with lipopolysaccharide*, **Nutr Res**, 1995, 15, 369-380.
14. Chvapil, M D., Ph D, Dsc., *Effect of zinc on cells and biomembranes*, **Med Clin North Am**, 1976, 60, 799-812.
15. Cavaillon J M., Fitting C., Haeffner-Cavaillon N., Kirsch S J and Warren H S., *Cytokine response by monocytes and macrophages to free and lipoprotein bound lipopolysaccharide.*, **Infect Immun.**, 1990, 58, 2375.
16. Cunningham-Rundles S e tal, *Physiological and Pharmacological effects of zinc on immune response*, **Ann N Y Acad Sci**, 1990, 113-122.
17. Driessen C., Hirv K., Rink L., Kirchner H., *Induction of cytokines by zinc ions in human peripheral blood monocytes*, **Lymphokine Cytokine Res**, 1994, 13, 15-20.
18. Dinarello C A., *Biology of interleukin-1*, **FASEB J.**, 1988, 2, 108-115.
19. Espinosa A., H E., *Influencia de ocho elementos químicos en la respuesta inmunitaria*, Facultad de Química. UNAM, México, 1989, TESIS
20. Fosmire Gary J., *Zinc toxicity*, **Am J Clin Nutr**, 1990, 51, 225-227.
21. Garg H K., Singhal KC., Arshad Z., *A study of the effect of oral zinc supplementation during pregnancy on pregnancy outcome*, **Indian J Physiol Pharmacol.**, 1993, 37, 4, 276-284.
22. Garvey J S e tal, *Meth inmunol*, 30 ed. W A Benjamin INC, Canada, 1977, *Methods in immunology*, 473-476.
23. Goldenberg R L., e tal., *The effect of zinc supplementation on pregnancy outcome*, **JAMA**, 1995, 274, 463-468
24. Gyorffy Edwin J, and Chan Hung, *Copper Deficiency and microcytic anemia resulting from prolonged ingestion of over-the-counter zinc*, **Am J Gastroenterol**, 1992, 87, 1054-1055.
25. Herrera O., M A., *Inmunomodulación por zinc en diferentes etapas del desarrollo*, Facultad de Química. UNAM, México, 1995, TESIS

26. James, S J., Wendseid M and Makinodan T., *Macrophage-Mediated depression of T cell proliferation in zinc-deficient mice*, **Nut and Immunol**, 1987, 1982-1988.
27. Jungi T W., *A rapid and sensitive method allowing photometric determination of erythrophagocytosis by mononuclear phagocytes*, **J Immunol met**, 1985, 82, 141-153.
28. Keen Carl L., Gershiwin Eric M., *Zinc deficiency and immune fuction*, **Ann Rev Nutr**, 1990, 10, 415-431.
29. Leibbrandt M E., Koropatnick J., *Activation of human monocytes with lipopolysaccharide induces metallothionein expression and diminished by zinc*, **Tox Appl Pharmacol.**, 1994, 124, 72-81.
30. Mackaness G B., *The influence of immunologically committed lymphoid cell on macrophag activity in vitro.*, **J Exp Med.**, 1969, 129, 973-992.
31. Oppenheim J J, Kovacs E J, Matsushima K, Durum S, *There is more than one interleukin-1*, **Immunol Today**. 1986, 7, 45-56.
1. Peter A M J., Bertram P., Gahr M., Speer C P., *Reduced Secretion of interleukin-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  by neonatal monocytes*, **Biol Neonate**, 1993, 63, 157-162.
33. Ralph van Furth, *Monocytes.*, **Encyclopedia of immunology**. Roitt (Ed). Academic Press., 1992, 1092-1093.
34. Ralph van Furth, *Mononuclear phagocyte system.*, **Encyclopedia of immunology**. Roitt (Ed). Academic Press., 1992, 1094-1097.
35. Roos D., *Neutrophils.*, **Encyclopedia of immunology**. Roitt (Ed). Academic Press., 1992, 1163-1166.
36. Root R K., Cohen M S., *The microbicidal mechanisms of human neutrophils.*, **Rev Infect Dis**, 1981, 3, 3, 565-598.
37. Salmenpera L, Perheentupa J, Pakarinen P, Siimes M A, *Zinc supplementation of infant formula*, **Am J Clin Nutr.**, 1994, 59, 985-989.
38. Scuderi P., *Differential effects of copper and zinc on human peripheral blood monocyte cytokine secretion*, **Cell Immunol**, 1990, 126, 391-405.

39. Smith K L, Lawrence D A., *Immunomodulation of in vitro Antigen presentation by cations toxicology and applied pharmacology*, **Tox Appl Pharmacol**, 1988, 96, 476-484.
40. Staties D P, e tal., *Inmunología básica y clínica*, 6ª ed, **El Manual Moderno**, México, 1988, 89-107.
41. Sung S S J., Nelson R S., Silverstein S C., *Yeast mannans inhibit binding and phagocytosis of zymosan by mouse peritoneal macrophages*, **J cell biol**, 1983, 96, 160-166.
42. Taubeneck M W, Datson G P, Rogers J M, Keen C L, *Altered maternal zinc metabolism following exposure to diverse developmental toxicants*, **Reprod Tox**, 1994, 8, 25-40.
43. Verhoef J., *Phagocytosis.*, **Encyclopedia of immunology**. Roitt (Ed). Academic Press., 1992., 1220-1222.
44. Virella G., Goust J M., Fudenberg H H., *Introduction to Medical Immunology*, *Immunology series*, 2ª ed, **Marcel Dekker, INC**, New York, 1990, 323-339.
45. Walravens P A., e tal., *Zinc supplementation in infants with a nutritional pattern of failure to thrive: a double-blind controlled study*, **Pediatrics**, 1989, 83, 532-538.
46. Watson W., Oen K, Ramdahin R, Harman C., *Immunoglobulin and cytokine production by neonatal lymphocytes*, **Clin Exp Immunol.**, 1991, 83, 169-174.
47. Wellinghausen N, Kirchner H, Rink L., *The immunobiology of zinc*, **Immunol Today**, 1997, 11, 80-82.
48. Wills R M., Savory J., *Trace metals: essential nutrients or toxins*, **Clin Chem**, 1992, 38, 8, 1565-1573.
49. Wirth J J., Fraker P J., Kierszenbaum F., *Changes in the levels of marker expression by mononuclear phagocytes in zinc-deficient mice*, **J Nutr.**, 1984, 114, 1826-1833.